

1 附件 1

2
3 《慢病毒载体 RCL 检测问题与解答》
4 (征求意见稿)
5

6 一、概述

7 近年来，慢病毒载体在临床上得到广泛应用，其可以直接作
8 接作为载体产品用于人体，也可以介导目的基因在靶细胞
9 (如 T 细胞) 的转移和表达以制备体外基因修饰细胞用于人
10 体。目前临床使用的慢病毒载体系统经过了改造和优化，比
11 如删除非必需基因、减少转移质粒与包装质粒序列间的同源
12 性、降低质粒载体/辅助基因序列与包装细胞 DNA 之间的同
13 源性、将辅助基因序列分离于不同的质粒中，以降低同源/非
14 同源重组形成可复制型慢病毒 (Replication competent
15 virus, RCL)。虽然这些改造极大降低了形成可复制型病毒
16 的风险，但考虑到可复制型病毒形成机制和结构较为复杂，
17 目前各国监管机构仍将 RCL 检测作为慢病毒载体质量研究和
18 控制的重要项目。

19 稳定的慢病毒载体包装细胞系不容易制备和获得，通常
20 使用多个质粒瞬时转染细胞用于慢病毒载体的生产。目前临
21 床上使用的慢病毒载体系统通常是基于 HIV-1 病毒骨架结构
22 并采用水泡型口炎病毒糖蛋白 (VSV-G) 进行了包膜替换，下

23 文所述内容也是针对这类慢病毒载体系统生产中产生的 RCL
24 提出一般性建议。

25 根据目前国内申报细胞和基因治疗产品情况，慢病毒载
26 体采用细胞培养法进行 RCL 检测大多数委托第三方检测机构，
27 但也有部分企业采用自建方法。由于我国目前尚未颁布针对
28 RCL 检测的针对性技术指南，因而在检测样品、检测量、检
29 测方法和方法学验证等方面存在诸多共性问题。药品审评中
30 心结合初步调研情况以及国外监管相关技术指南的要求，形
31 成这些问题的初步建议，以供申请人/检测机构参考。

32 **二、常见问题与解答**

33 **1、检测样品**

34 **问题 1. 慢病毒载体生产阶段，载体上清液和生产终末**
35 **细胞同时检测或选择其一？每个生产批次的病毒载体上清**
36 **液和生产终末细胞是否均要求检测 RCL？**

37 **答复：**

38 慢病毒载体的生产通常采用瞬时转染体系，根据 RCL 形
39 成机制，在细胞包装/生产阶段可能发生同源或者非同源重
40 组形成具有复制能力的病毒，而在病毒上清液收获后至纯化
41 阶段形成具有复制能力的病毒的可能性极小，且考虑到基因
42 重组形成 RCL 的风险在批次之间可能存在差异，且研究发现
43 病毒载体上清液和 EOPC 中并不总是一致的检测到 RCL，因而
44 为了确保病毒载体阶段无 RCL 污染的风险，建议每个临床试

45 验用批次的病毒载体上清液和生产终末细胞（EOPC）均需要
46 采用细胞培养法进行 RCL 检测。

47 问题 2. 采用细胞培养法检测 RCL 样品是选择未处理的
48 病毒上清液、还是选择经过浓缩后的病毒上清液、或者选择
49 纯化后的病毒成品？

50 答复：

51 通常情况下，应选择最易检出 RCL 的样品进行检测。考
52 虑到下游纯化工艺可能会破坏样本中可能存在的 RCL，因而，
53 在条件允许情况下，检测样品优先选择未处理的病毒上清液。

54 但是按照慢病毒实际的商业化生产工艺情况以及取样
55 量计算的要求，可能存在上清液取样量较大，现有的检测条
56 件和检测能力无法满足要求的情况，因而，也可以考虑选择
57 经过浓缩处理的病毒上清液或病毒成品进行 RCL 检测，但需
58 要提供充分依据证明纯化工艺及相关操作不会破坏 RCL。需
59 要特别关注，经浓缩处理的病毒上清液或者病毒载体成品浓
60 度较高，可能对扩增细胞有毒性，因而试验中需要充分考虑
61 检测样品对检测方法的干扰。

62 2、检测量

63 问题 1. 病毒上清液取样量如何计算？慢病毒检验时可
64 能还未获得实际转导参数（如 MOI、最大细胞量和病毒滴度），
65 如何基于计算公式计算检测体积？如果取样点在慢病毒收
66 获液阶段，直接按照收获液的测定滴度代入公式计算合理还

67 是按照慢病毒成品滴度计算后再除以慢病毒批次的收率合
68 理？

69 答复：

70 根据早期使用逆转录病毒载体的经验（包括生产经验和
71 临床使用经验），建议测试至少 5%的总上清液或 300ml（总体
72 积大于 6L 时），以确保病毒载体中无 RCL 污染的风险。但随
73 着工艺优化及发展，以及临床使用经验的持续积累，推荐测
74 试足够的病毒上清液，以确保取样量满足检测出 1RCR/剂量的
75 的可能性为 95%。考虑到实际生产时可能还未完全确认慢病
76 毒转导体外细胞的最大剂量信息，故无法基于计算公式得到
77 需要检测的病毒上清液的最大量，也可以考虑采用 5%的总上
78 清液或 300ml 进行取样。

79 按照现行 FDA 指南中计算公式，对于体外转导细胞计算
80 剂量当量时使用的病毒滴度是病毒成品的滴度，按照此滴度
81 计算后得到的检测体积并非是直接用于检测的病毒收获上
82 清液的体积，实际检测体积还应在此计算公式计算体积基础
83 上除以病毒载体批次的实际收率，或者以病毒收获上清液批
84 次的实际测定滴度带入公式进行计算。

85 资料中应详细提供样品检测量计算的过程及依据，以确
86 保检测量满足检测出 1RCL/剂量的可能性为 95%。

87 问题 2. 生产终末细胞检测量按照总细胞量的 1%或 $1 \times$
88 10^8 个（以较小计算量作为检测用量）是否可以？

89 **答复:**

90 生产终末细胞 (EOPC) 指收获病毒上清液阶段分离的细
91 胞或者多次收获病毒上清液最后获得的细胞。检测量通常按
92 照总细胞量的 1%或 1×10^8 个 (以较小计算量作为检测用量)
93 进行检测。

94 **3、检测方法**

95 **问题 1. 细胞共培养法检测 RCL 只进行连续扩增培养,**
96 **而不在扩增期后增加指示期是否可行?**

97 **答复:**

98 由于缺少辅助基因的病毒可能相比野生型病毒生长速
99 度有所减缓, 另外, 虽然 p24 在扩增阶段结束时通常低于检
100 测限, 但慢病毒载体中 p24 的高浓度偶尔会导致 21 天时仍
101 能检测到低水平的 p24。此外, 在没有 RCL 的情况下, 在扩
102 增期细胞中可能发生低水平的序列转移 (如 psi-gag 或 VSV-
103 G)(可能是由于残留质粒污染), 但在经过指示期培养后再次
104 进行检测可以确保检测结果的准确性和可靠性。但是如果在
105 扩增阶段有充分数据证明连续传代培养可以去除残留的蛋
106 白 (如 P24 蛋白) 和质粒残留导致的假阳性风险, 或者在扩
107 增阶段供试品组可以观察到细胞病变, 则可不进行指示期培
108 养。如不能提供充分数据, 则建议将病毒载体上清液和生产
109 终末细胞与允许细胞系共培养并至少连续 5 次传代, 以扩增
110 任何潜在的 RCL, 在扩增培养结束后对共培养物进行离心处

111 理，将收集的上清液再次与初始 C8166 细胞进行共培养作为
112 指示期，并收集指示期的样品进行 RCL 的检测。

113 **问题 2. 细胞共培养法检测 RCL 仅选择一种终点检测方**
114 **法是否可行？**

115 **答复：**

116 由于 RCL 形成机制较为复杂，结构尚不明确，目前常见
117 的几种检测终点指标均是基于 RCL 理论上的结构选择的终点
118 指标以侧面反映是否有 RCL。但由于不同的终点检测方法适
119 用性不同，因而，鼓励申请人在进行 RCL 检测时采用不同原
120 理的终点检测方法，比如可以考虑选择序列检测（病毒序列
121 的 PCR）与功能（标记物 PERT）或蛋白表达（p24 ELISA）检
122 测一起用于 RCL 检测，以相互验证检测结果的真实性和可靠
123 性。但需要注意，如果两个终点检测结果都为阳性，则一般
124 可判断 RCL 阳性，如果一个终点结果呈阳性另一个终点结果
125 呈阴性，则需要提供充分的调查和研究资料，以确认检测结
126 果的可靠性。

127 **问题 3. 以 HIV-1 为基础的慢病毒载体选择阳性对照病**
128 **毒的一般考虑？比如野生型 HIV-1、减毒 HIV-1（包膜保留**
129 **野生型病毒包膜还是替换为 VSV-G 包膜）等？阳性病毒需**
130 **要提供哪些研究数据？**

131 **答复：**

132 临床使用的慢病毒的包膜蛋白大多数为 VSV-G，理论上

133 使用以 VSV-G 包膜蛋白的 HIV-1 毒株作为阳性对照，比使
134 用野生 HIV-1 或减毒的 HIV-1 更合理。但是由于编码异源 Env
135 （例如 VSV-G）和 Gag/Pol 的阳性病毒对人员和环境具有较
136 大的危害，且目前尚未有充分证据表明 RCL 与野生型 HIV-1
137 具有相似的生长特性和理化特性，也未有充分证据表明 RCL
138 与 VSV-G 包膜蛋白的 HIV-1 毒株具有相似的生长特性和理
139 化特性。所以，考虑到阳性病毒的生长特性、毒力和分析人
140 员的安全性，一般不建议使用野生型 HIV-1 和 VSV-G 包膜蛋
141 白替换的 HIV-1 毒株作为 RCL 检测的阳性对照病毒，建议选
142 择 HIV 弱毒株或重组的条件复制型慢病毒载体作为阳性对照
143 病毒。

144 阳性病毒对于确认检测方法的灵敏度至关重要，因而建
145 议申报资料中提供阳性病毒的来源、制备工艺、主要功能元
146 件及生物学滴度的详细资料。

147 **问题 4. 实验组设置的要求？实验组中是否必须设立抑**
148 **制对照组？如是，是否每一批次载体上清液/生产终末细胞**
149 **检测时均需要设立抑制对照组，还是在方法验证时设置抑制**
150 **对照组？**

151 **答复：**

152 实验组通常包括阳性对照、阴性对照、抑制对照组和样
153 品组。阳性对照和阴性对照组对于评估方法的专属性、灵敏
154 度和重现性至关重要，因而实验组中应设置合理的阴性对照

155 和阳性对照。

156 由于进行 RCL 方法验证时使用的样品与实际试验测定用
157 样品可能在病毒滴度、基质成分等方面均存在不同，且研究
158 发现高滴度慢病毒上清液可能对共培养细胞的扩增有抑制
159 作用，进而影响 RCL 检测灵敏度。同时，检测样品中除病毒
160 以外的其他组分可能也会影响 RCL 的检测。所以在每个批次
161 实际样品检测时均建议设置抑制对照组，以证明检测样品对
162 阳性病毒的检出无影响。抑制对照组的设计通常是在检测样
163 品中加入阳性病毒，阳性病毒的加入量可参考检测方法的检
164 测限。

165 **问题 5. 共培养细胞的选择除了 C8166 细胞外，其他细**
166 **胞是否可以选？是否需要建库和检定？**

167 **答复：**

168 细胞系的选择和病毒的包膜有关，同时也要考虑细胞可
169 否支持 HIV 病毒核心的复制，通常选择病毒易感和易复制的
170 细胞系作为共培养细胞。鉴于目前 C8166 细胞已经作为比较
171 公认的 VSV-G 假型 HIV-1 和相关慢病毒易感的细胞系，所以
172 建议优先选择 C8166 细胞用于 SV-G 假型 HIV-1 和相关慢病
173 毒 RCL 检测时的共培养细胞。如选用其他细胞系应开展全面
174 的表征研究，并验证方法能达到等效性后方可考虑作为共培
175 养细胞。

176 C8166 细胞应按照《中国药典》检定用细胞相关要求提

177 供全面的研究资料，如合法来源证明性文件、细胞库建库过
178 程资料、细胞库检定研究资料等。

179 4、方法学验证

180 问题 1. RCL 检测方法学验证的要求？

181 答复：

182 RCL 的检测分为共培养和终点检测两个实验阶段，验证
183 也需要考虑开展两个阶段的验证。共培养阶段应设立合理的
184 阳性对照组、阴性对照组和抑制对照组，并根据终点检测结
185 果进行最终试验结果的判断，通常开展的验证项目包括专属
186 性、检测限、耐用性等，专属性应考虑阳性对照组检出率、
187 阴性对照检出率和抑制对照组检出率，检出率的设定标准应
188 有合理的依据。检测限验证通常通过设置不同稀释度的阳性
189 对照，并确保检出率达到一定标准。耐用性验证应结合可能
190 影响方法的因素进行设置，比如传代代次、传代时间、细胞
191 密度等。RCL 的终点检测方法通常是基于分子生物学的定量
192 或定性方法，可根据 ICH Q2、现行版《中国药典》关于分析
193 方法验证相关指导原则要求开展相应的验证，一般情况下，
194 定量检测方法应进行专属性、检测限、准确度、精密度、线
195 性、范围和耐用性等项目的验证，定性检测方法应进行专属
196 性和耐用性的验证。

197 三、参考文献

198 1. FDA. Guidance for Industry – Supplemental guidance

199 on testing for replication competent retrovirus in
200 retroviral vector based gene therapy products and
201 during follow-up of patients in clinical trials using
202 retroviral vector. 2006.

203 2. FDA. Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene
204 Therapy Products for Replication Competent Retrovirus
205 During Product Manufacture and Patient Follow-up.
206 2020.

207 3. EMA. Guideline on Development and Manufacture of
208 Lentiviral Vectors. 2004.

209 4. EMA. Gene transfer medicinal products for human
210 use. 2019.

211 5. 体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则(试行).
212 2022.

213

214